

Células dendríticas especializadas en presentación de antígenos exógenos a linfocitos T citotóxicos

Specialized dendritic cells in cross-presentation of exogenous antigens to cytotoxic T lymphocytes

C. Alfaro¹, C. Oñate¹, A. Rodríguez¹, J.L. Pérez-Gracia², M. Fernández de Sanmamed^{1,2}, I. Melero^{1,2}

RESUMEN

Las células dendríticas son células de origen hematopoiético, que expresan constitutivamente moléculas presentadoras de antígeno MHC de clase I y II, y son funcionalmente las inductoras más potentes de la activación y proliferación de linfocitos T a los que presentan antígenos. Los linfocitos T CD8⁺ proliferan y adquieren capacidad citotóxica cuando reconocen su antígeno específico presentado en la superficie de una o varias células dendríticas con las que interactúan. Sin embargo, solamente algunas subpoblaciones de células dendríticas pueden presentar antígenos internalizados desde el exterior celular a través de procesos de pinocitosis y fagocitosis a precursores de linfocitos T citotóxicos. Esta función se denomina presentación cruzada o presentación subrogada (en inglés, crosspresentation) y requiere mecanismos de translocación de los antígenos que se encuentran internalizados en fagosomas al citosol para su procesamiento. Se ha establecido que la diferenciación de subpoblaciones de células dendríticas con capacidad de efectuar este tipo de presentación cruzada a linfocitos T CD8⁺ son dependientes del factor de crecimiento FLT-3L y del factor de transcripción BATF3. Presentan peculiaridades tanto funcionales como de marcadores de membrana que nos permiten identificarlas. En ratones se distinguen por la expresión de CD8 α y en humanos por la de CD141 (BDCA-3). Esta población en ambas especies es capaz de internalizar selectivamente restos de células necróticas mediante su receptor CLEC9A que se une a actina polimerizada extracelular. Disponen del receptor de quimiocinas XCR1 que asegura su encuentro con linfocitos T CD8⁺. La vacunación terapéutica con antígenos tumorales utilizando células dendríticas es una estrategia en desarrollo para el tratamiento del cáncer. La utilización de subpoblaciones de células dendríticas con mayor capacidad de realizar presentación cruzada o subrogada remedia los mecanismos naturales de inmunización para inducir linfocitos T citotóxicos. La dianaización *in vivo* de antígenos a estas subpoblaciones celulares mediante anticuerpos monoclonales anti-DEC-205 o anti-CLEC9A consigue respuestas inmunitarias muy intensas y se están probando en ensayos clínicos frente a viriasis crónicas y enfermedades malignas.

Palabras clave. Células dendríticas. Presentación cruzada/ Presentación subrogada. CD8-alfa. BDCA-3. CLEC9A.

ABSTRACT

Dendritic cells (DC) are cells of hematopoietic origin, which constitutively express MHC class I and II, and are functionally the most potent inducers of T-lymphocyte activation and proliferation. CD8⁺ T lymphocytes proliferate and acquire cytotoxic functions upon recognition of their cognate antigen on the surface of one or various dendritic cells with which they interact. However, only some DC subsets are able to present antigen to cytotoxic T cell precursors as taken up from extracellular sources. This function is termed cross-presentation (in Spanish, presentación cruzada or presentación subrogada) and requires shuttle mechanisms from phagosomes to the cytosol for antigen processing. It has been demonstrated that the differentiation of DC with these capabilities is dependent on FLT-3L and the transcription factor BATF3. They express peculiar functions and differentiation markers. These cells are distinguished in mice by surface CD8 α features, while CD141 (BDCA-3) marks these cells in the human. These subpopulations are capable of selective internalization of necrotic cell debris by means of their CLEC9A lectin which is a receptor for extracellular polymerized actin. Expression of the chemokine receptor XCR1 favours contact with CD8⁺ T cells. Therapeutic vaccination with tumour antigens using DC is a strategy under development for the treatment of cancer. The use of DC subsets with more prominent capabilities for cross-presentation would mimic the natural mechanisms of immunization to induce cytotoxic T lymphocytes. *In vivo* targeting of antigens with monoclonal antibodies against DEC-205 or CLEC9A attains very robust immune responses and is a strategy undergoing clinical trials for chronic viral diseases and malignancies.

Key words. Dendritic cells. Cross-presentation. CD8-alpha. BDCA-3. CLEC9A.

An. Sist. Sanit. Navar. 2013; 36 (3): 519-537

1. Área de Terapia Génica y Hepatología. Centro de Investigación Médica Aplicada. Universidad de Navarra. Pamplona.
2. Departamento de Oncología Médica. Clínica Universidad de Navarra. Universidad de Navarra. Pamplona.

Recepción: 19 de junio de 2013

Aceptación provisional: 3 de septiembre de 2013

Aceptación definitiva: 11 de septiembre de 2013

Correspondencia:

Ignacio Melero
Clínica Universidad de Navarra (CUN)
Centro de Investigación Médica Aplicada (CIMA)
Avda. Pio XII, 55
31008 Pamplona
imelero@unav.es

CÉLULAS DENDRÍTICAS

Las células dendríticas fueron observadas por primera vez en la piel por el histólogo alemán Paul Langerhans a finales del siglo XIX. Sin embargo la función inmunológica de las células de Langerhans de la piel pasó inadvertida durante al menos siete décadas. El término célula dendrítica (CD) no fue utilizado hasta 1973, por R. M. Steinman y Z.A. Cohn, y deriva del hecho de que estas células tienen prolongaciones que remedan la morfología de las dendritas neuronales. Los estudios de Steinman definieron las CD, observando aquellas que ahora clasificamos en el subgrupo de CD mieloides o convencionales. Sus estudios postularon las CD como una población celular minoritaria de órganos linfoides caracterizada morfológicamente por múltiples prolongaciones en forma de ramas (dendritas) y que era capaz de activar linfocitos T sin experiencia antigénica previa¹⁻³. Por estos descubrimientos le fue otorgado el premio Nobel de medicina en 2011, galardón que premiaba una larga trayectoria de descubrimientos dedicada a esclarecer paulatinamente la relevancia de estas células en la fisiología del sistema inmunitario^{4,5}. El profesor Steinman no llegó a conocer la concesión de este galardón ya que falleció dos días antes de que le fuera comunicada la noticia (Fundación Nobel, <http://www.nobelprize.org/>).

Las CD, según Steinman, son los “centinelas naturales del sistema inmune”, siendo las encargadas de decidir si se induce o si no se pone en marcha una respuesta inmunitaria adaptativa ante la invasión de gérmenes patógenos⁶. Las CD derivan de precursores hematopoyéticos y son principalmente de linaje mieloide, aunque se ha puesto de manifiesto su plasticidad ontogénica⁷. A menudo, aunque no siempre, presentan una morfología con prolongaciones celulares retráctiles que les permiten aumentar la superficie para establecer contactos intercelulares⁸.

Al ser las principales células profesionales presentadoras de antígeno, son importantes tanto en la estimulación/activación como en la regulación de la inten-

sidad de la respuesta de linfocitos T y linfocitos B⁹. Se postula que, en ausencia de estímulos microbianos o inflamatorios, las CD permanecen en estado de reposo (llamado inmaduro), en el cual su capacidad de activación de linfocitos T se encuentra activamente reprimida¹⁰. La exposición de las CD a agentes infecciosos provoca varios cambios funcionales y de expresión génica, los cuales en forma coordinada, mejoran notoriamente su capacidad para interactuar con los linfocitos T a los que presentan antígeno y promover tanto su proliferación como su diferenciación funcional¹¹. El término maduración de células dendríticas se utiliza para referirnos a esta activación funcional, que se plasma en la puesta en marcha de un programa de expresión génica y en la modificación de su patrón de migración en respuesta a estímulos quimiotácticos, merced a cambios en la expresión de receptores de quimioquinas¹².

En el estado inmaduro, las CD están especializadas en internalizar material potencialmente antigénico tanto exógeno al organismo como endógeno (procedente principalmente de detritus celulares) y para ello poseen una maquinaria de endocitosis muy eficiente¹³. La captación de antígenos está facilitada por receptores endocíticos de superficie¹⁴, tales como: receptores para el Fc de las inmunoglobulinas (CD32), receptores de complemento, integrinas, receptores tipo lectina C (CD209, CD205, BDCA, langerina, receptores de manosa) y receptores tipo *scavenger* (LOX-1, CD91, CD36).

En el estado inmaduro, las CD muestran escasa densidad en su superficie de moléculas presentadoras de antígeno del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I y II (MCH-I y MHC-II) y de moléculas co-estimuladoras (CD40, CD80 y CD86). Por el contrario su superficie es rica en receptores implicados en captación de antígeno por endocitosis, fagocitosis y, sobre todo, macropinocitosis, tales como los receptores para el Fc de inmunoglobulina, de manosa y para factores activados del complemento.

En esta situación de inmadurez (o falta de activación), las CD son capaces de in-

ducir y mantener la tolerancia frente a autoantígenos en tejidos periféricos, ya que continuamente presentan los antígenos propios a los linfocitos T, de manera que en los linfocitos específicos de autoantígenos se induce apoptosis o anergia funcional¹⁵. Por tanto, la presentación de autoantígenos por células dendríticas inmaduras en condiciones de normalidad elimina del repertorio de reconocimiento a aquellos clones de linfocitos T potencialmente auto-reactivos¹⁰.

En el tejido inflamado aumenta considerablemente la capacidad de macropinocitosis de las CD y la expresión de receptores que permiten la captación de antígeno. Asimismo parte de los monocitos que penetran el tejido *de novo* para formar el infiltrado inflamatorio, se diferencian *in situ* en células dendríticas¹⁶. También se activa la biosíntesis de moléculas de MHC-I y II, que forman complejos con eficiencia tanto con péptidos originados en la propia célula dendrítica como con polipéptidos externos que han captado en el tejido inflamado. Cuando son estimuladas por citoquinas proinflamatorias (TNF- α , IL-1 β , IL-6, INF- α) o por el ligando de CD40 (CD40L), expresado sobre linfocitos T cooperadores (T *helper*), las CD se activan diferenciándose a CD maduras (CDm). En este estado expresan en la superficie celular CD80 y CD86 con mayor densidad¹⁶. Además, las CDm también adquieren la expresión de CD83 en su superficie. Estas glicoproteínas de membrana confieren capacidad para estimular aquellos linfocitos T que reconocen sobre ellas su antígeno específico.

Otra característica de las CDm es su capacidad regulada de secretar IL-12¹⁷ y de otras citoquinas activadoras de células T tales como IL-15^{18,19}, IFN- α ^{20,21} o IL-2²². La producción de IL-12 está implicada en la inducción de respuestas de linfocitos T *helper* productores de IFN- γ (linfocitos Th1) y en la activación de linfocitos T citotóxicos (CTL) efectoras²³.

Al madurar, las CD modifican el patrón de expresión de receptores de quimioquinas de forma que se pierde la expresión de CCR1 y CCR5 y así pueden salir del territorio inflamado²⁴. La adquisición de la ex-

presión de CCR7 permite que sean atraídas a vasos linfáticos aferentes para comenzar su recorrido rumbo hacia órganos linfoides secundarios²⁵⁻²⁷.

Como resultado de su maduración, las CD experimentan un incremento de la estabilidad en la membrana plasmática de sus complejos MHC/péptido y pierden la capacidad de captación y procesamiento de nuevos antígenos. Se piensa que estos cambios disminuyen dicho procesamiento durante la migración a los órganos linfoides secundarios (ganglios linfáticos, bazo, amígdalas o tejido linfoide asociado a mucosas).

Cuando llegan a dichos órganos, las células dendríticas maduras se emplazan en las zonas interfoliculares del paracórtex ricas en células T, donde realizan su función de presentar péptidos antigénicos a aquellas células T específicas que allí se encuentran²⁴. Sin el guiado de las quimioquinas, el encuentro entre el linfocito específico y la célula presentadora sería un fenómeno muy improbable. En una serie de encuentros concertados por quimioquinas y en los que intervienen moléculas de adhesión los linfocitos T rastrean aquellas CD sobre la que su receptor clonotípico de antígeno (TCR) efectúa el reconocimiento específico. El sentido fisiológico de estos fenómenos celulares es que de esta manera se inicie y sostenga la respuesta inmune contra un agente agresor cuyos antígenos han sido captados en un foco inflamatorio²⁴. Esta respuesta implica la multiplicación de los linfocitos T específicos para el antígeno (expansión clonal) y la adquisición de funciones efectoras, proinflamatorias, citolíticas o de cooperación para respuestas de anticuerpos.

Existen dos clases de estímulos que inducen la transformación de las CD en formas inmunológicamente maduras y, por consiguiente, capaces de activar linfocitos T. Uno de ellos consiste en el reconocimiento de patrones moleculares asociados a gérmenes²⁸. Carles Janeway fue el primer inmunólogo en postular que la detección de un antígeno en el contexto de señales moleculares de infección eran críticos para la inducción de respuestas inmunitarias.

El otro tipo de estímulos depende de la exposición de las CD a señales endógenas peligrosas, como las sustancias liberadas por células dañadas^{29,31}. La importancia del daño celular fue postulada por Polly Matzinger como un factor crítico en la iniciación de la inmunidad²⁹. Cada vez parece más claro que sustancias endógenas que denotan daño (alarminas) y patrones moleculares de gérmenes (PAMPs) actúan de modo coordinado en la activación de CD³². Existen diferentes tipos de sistemas de receptores que las CD utilizan para reconocer patrones moleculares asociados a gérmenes o a daño celular (derivados de biomoléculas de virus, bacterias, sustancias producidas por células dañadas, etc)²³. El receptor *toll-like* receptor-4 (TLR-4) está implicado tanto en la detección de endotoxina bacteriana como en la de señales moleculares de estrés, tales como la presencia extracelular de la proteína nuclear HMGB1³³.

Se ha demostrado que según la naturaleza del estímulo madurativo, las CDm pueden modificar sus funciones, adecuando el tipo de inmunidad que despiertan a la naturaleza del agente nocivo que la desencadena. Se ponen en marcha así respuestas linfocitarias con funciones efectoras diversas y especializadas^{17,34,35}. Asimismo, hay distintas líneas experimentales que sugieren que aunque las CD experimentan cambios madurativos en respuesta a citoquinas proinflamatorias, en ausencia de patrones moleculares de gérmenes o daño tisular las señales son insuficientes para capacitarlas de cara a la activación de linfocitos T efectoros²⁹.

Se han efectuado numerosos experimentos utilizando CD diferenciadas en cultivos a partir de monocitos de sangre periférica en humanos o de precursores de médula ósea de ratones en presencia de GM-CSF y otros factores de crecimiento^{36,37}. Los monocitos CD14⁺ o suspensiones celulares de médula ósea son cultivados *in vitro* en presencia del factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) e IL-4³⁸, IFN- α ³⁹ o IL-15⁴⁰, logrando así su transformación en potentes células presentadoras^{15,23,34,41}.

Existe una subpoblación de CD que circula en la sangre y está presente en órganos linfáticos denominada CD plasmocitoide. Su rasgo funcional más llamativo es que producen grandes cantidades de las proteínas antivirales INF- α e IFN- β en respuesta a la presencia de virus⁴²⁻⁴⁴. Las CD plasmocitoides detectan la presencia de RNA de características virales en sus endosomas a través del receptor TLR-7⁴⁵⁻⁴⁷. El papel de estas células en presentación antigénica ha sido controvertido, pero en artículos recientes se ha demostrado su capacidad de presentar antígeno tanto a linfocitos T CD4 y CD8 en las condiciones adecuadas^{48,49}.

EL FENÓMENO DE LA PRESENTACIÓN CRUZADA O SUBROGADA A LINFOCITOS T CITOTÓXICOS

Los fenómenos bioquímicos de proteólisis y ensamblaje en moléculas presentadoras de antígeno se conocen como procesamiento antigénico e implican la degradación de los antígenos proteicos a péptidos más cortos. Estos péptidos son adsorbidos en moléculas de presentación antigénica del complejo principal de histocompatibilidad y así son dispuestos para su presentación en la membrana plasmática⁵⁰. La presentación antigénica es el conjunto de fenómenos y mecanismos que hacen accesible en la membrana de la célula presentadora de esos péptidos asociados a moléculas MHC para su reconocimiento por parte de los linfocitos T⁵⁰.

Las células implicadas en el proceso de presentación de antígeno son, por un lado, las células presentadoras que muestran en su membrana los complejos MHC-antígeno y, por otro, los linfocitos T que aportan sus receptores específicos de antígeno denominados TCRs, que son capaces de reconocer el péptido antigénico en asociación a una molécula presentadora propia⁵¹. La activación de la célula T no sólo exige que exista un reconocimiento molecular entre el complejo MHC-antígeno y el TCR, sino que también requiere un conjunto adicional de interacciones entre las proteínas de

membrana de ambas células y de factores solubles paracrinós (citoquinas).

Dependiendo del tipo de antígeno y de la ruta de procesamiento los antígenos pueden presentarse asociados a moléculas de clase I (MHC-I) o moléculas de clase II (MHC-II), lo que permitirá el reconocimiento antigénico por subpoblaciones diferentes de linfocitos⁵¹. Todas las células nucleadas expresan moléculas de MHC de clase I en su membrana, pero solo las células presentadoras de antígeno (APC) especializadas presentan moléculas de MHC de clase II y, en condiciones normales, incluyen los macrófagos, las CD y los linfocitos B activados. A estas células que expresan MHC de clase II las denominamos células profesionales presentadoras de antígeno; si bien en sentido estricto solamente las células dendríticas son capaces de desempeñar estas funciones con la eficiencia necesaria para iniciar una respuesta inmunitaria a partir de linfocitos sin experiencia antigénica previa.

Las moléculas MHC de clase I, en una situación normal, se unen a péptidos derivados de proteínas propias (traducidas en la propia célula) que son degradadas en el proteasoma y, en el caso de una infección por un parásito intracelular (p. ej. virus, ciertas bacterias), absorben a péptidos derivados del patógeno. En ambos casos los péptidos (endógenos o microbianos) derivan del procesamiento citosólico del antígeno. Los péptidos resultantes de la degradación proteasómica son transportados al retículo endoplasmático rugoso (RER) para unirse a moléculas MHC de clase I recién formadas y que finalmente se exportan a la superficie celular a través del aparato de Golgi^{50,52,53}.

Las moléculas MHC de clase II se unen a péptidos derivados de antígenos exógenos, que previamente han sido captados por la célula presentadora mediante endocitosis o fagocitosis y se han proteolizado en fagolisosomas. Los péptidos exógenos se adsorben a las hendiduras de las moléculas de clase II que habían estado protegidas de la unión a péptidos durante su biosíntesis por el péptido CLIP de la cadena invariante⁵⁴.

Por tanto, existen dos tipos de rutas independientes para el procesamiento antigénico: la ruta citosólica y la ruta endocítica⁵¹. De acuerdo con estos paradigmas una célula profesional presentadora de antígeno solamente podría presentar antígenos microbianos asociados a moléculas de clase I y por tanto reconocibles por linfocitos T citotóxicos, si ella misma está experimentando la traducción de proteínas del parásito intracelular. En otras palabras, si está infectada por el germen.

La primera evidencia de que debían existir fenómenos de transferencia antigénica entre células de la economía y células profesionales de la presentación antigénica tuvo la autoría de Michael Bevan^{55,56}. En sus experimentos de transferencia de células hematopoyéticas idénticas en antígenos principales de histocompatibilidad (y por tanto en las moléculas presentadoras de clase I) podían inmunizar frente a antígenos menores de histocompatibilidad, derivados de variaciones en secuencias peptídicas de las proteínas codificadas por variantes alélicas en la misma especie presentes en células inyectadas. Sus experimentos concluyeron que células del receptor podían activar al sistema inmunitario presentando de modo subrogado los antígenos menores de histocompatibilidad presentes en las células del donante. El péptido presentado en estos experimentos es del donante mientras que la molécula de MHC presentadora es del receptor. El fenómeno recibió el nombre de activación cruzada (*crosspriming*) puesto que el resultado de la presentación antigénica era la activación linfocitaria (o *priming*) antígeno-específica. Ya se ha comentado que el resultado de la presentación antigénica puede ser tanto la activación como la represión de respuesta inmunitaria frente a un antígeno. En el caso de la presentación cruzada hablamos de *crosspriming* o *crossolerance*, según sea el resultado funcional sobre los linfocitos específicos de antígeno. Hemos elegido los términos castellanos presentación cruzada o presentación subrogada para traducir el vocablo inglés *crosspresentation*. Esto es así porque subrogación quiere decir en castellano la delegación o reemplazo en las

obligaciones y funciones hacia otros. El resultado final es la presentación de antígenos capturados o "exógenos" en moléculas de clase I. Esto es lo que hacen las células dendríticas con antígeno derivado de otras células.

Aunque la mayoría de las CD son capaces de captar antígenos y presentarlos a las células T CD4⁺ vía MHC de clase II, la capacidad de procesar antígenos exógenos y presentarlos a células T CD8⁺ vía MHC de clase I parece que está más restringida. La presentación cruzada o subrogada es crucial para la generación de respuestas de linfocitos T CD8⁺ citotóxicos en respuesta a patógenos intracelulares⁵⁷. Los linfocitos T citotóxicos son capaces de destruir células tumorales sobre las que reconocen el antígeno para el que son específicos y esto determina el intenso estudio de estos mecanismos⁵⁸.

La presentación cruzada o subrogada es posible solamente en CD que muestran una adaptación de sus vías endocíticas para el procesamiento de antígeno⁵⁷. Cuando una proteína o biopartícula es internalizada formando endosomas, éstos frecuentemente se fusionan con lisosomas ricos en proteasas. En estos fagolisosomas la digestión proteolítica es usualmente muy activa, se potencia con el pH ácido (menor de 5) y es tan procesiva que no permite la formación de péptidos presentables por moléculas de MHC de clase I. Se piensa que en las células dendríticas el compartimento de los endosomas tempranos tiene peculiaridades que permiten el escape de polipéptidos al citoplasma, aunque no está bien aclarado qué mecanismo molecular es el que permite el acceso al citoplasma⁵⁰. Se ha especulado con la baja actividad de las proteasas lisosomales por falta de acidificación, la inactivación de proteasas y la existencia de mecanismos de transporte activo en los que estaría implicada la proteína Sec22⁵⁹. Aunque la naturaleza bioquímica de la lanzadera entre endosoma y citoplasma es por el momento desconocida, es objeto de una intensa investigación. Una evidencia experimental muy elegante, aunque indirecta, que sugiere su existencia fue propuesta por J. A. Villadangos al demostrar que deter-

minados subtipos de CD sufren apoptosis cuando se las pone en presencia del factor proapoptótico citocromo C⁶⁰. Esta sustancia solamente activa la apoptosis cuando se encuentra libre en el citosol. Por tanto la inducción de apoptosis en la célula dendrítica indica que estas células han permitido el paso de proteína intacta, que adquirida mediante endocitosis, alcanza el citoplasma⁶⁰ (Fig. 1).

Las proteínas una vez liberadas al citoplasma son degradables por una proteinasa multicatalítica denominada proteasoma que está especializada en degradar polipéptidos no bien plegados y proteínas ubiquinadas. Experimentos con inhibidores del proteasoma han demostrado que es necesario un paso de digestión en este orgánulo citoplasmático para la presentación cruzada. Los péptidos producto de la digestión proteosómica son capturados por chaperonas que los transfieren a transportadores de péptidos selectivos (TAP-1/2) los cuales bombean los péptidos al interior del RER para ser cargados en moléculas de clase I que pueden anclarlas en su hendidura de unión (Fig. 1). Las células dendríticas carentes de TAP-1/2 no pueden presentar antígenos en moléculas de clase I y por tanto son incapaces de mediar presentación cruzada⁶¹.

El término presentación cruzada o subrogada se refiere a dos fenómenos potencialmente muy distintos entre sí. De un lado, la presentación de antígenos procedentes de la digestión de proteínas solubles endocitadas y, por otro lado, la presentación a partir de detritus celulares o restos apoptóticos habitualmente particulados⁶². Aun cuando la mayor parte de la experimentación se ha realizado con proteínas purificadas como antígenos modelo desde el punto de vista de la fisiología de la respuesta inmunitaria, la presentación de antígenos procedentes de células necróticas o cuerpos apoptóticos parece mucho más relevante. Aunque el fenómeno de presentación cruzada se puede observar con varios tipos de células dendríticas aisladas o diferenciadas en cultivo, existen subpoblaciones altamente especializadas en desempeñar estas funciones moleculares en un contexto relevante.

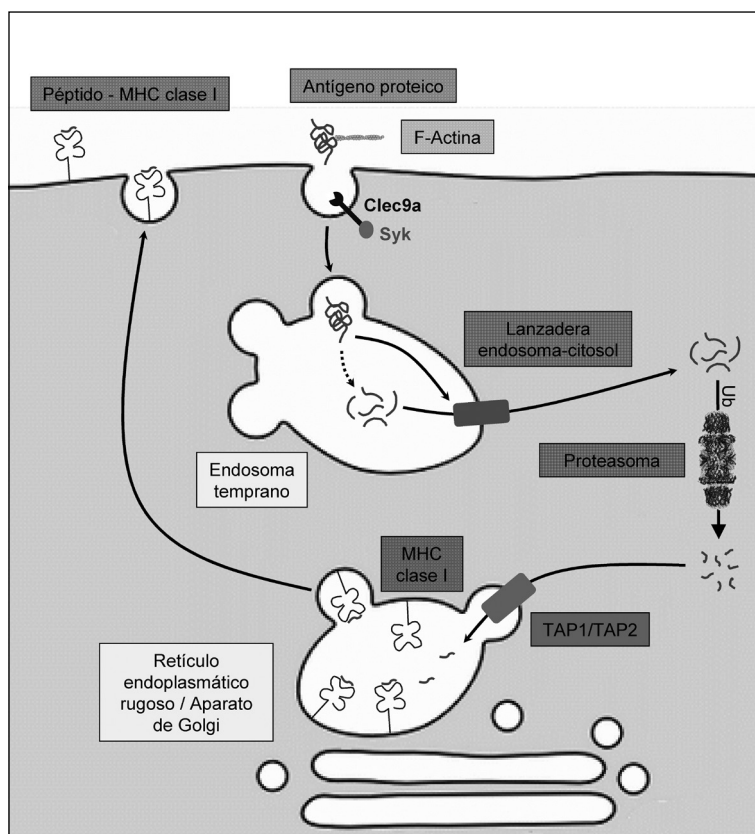


Figura 1. Mecanismos de presentación cruzada o subrogada a partir de restos celulares necróticos.

Esto es especialmente relevante si pensamos que el sistema inmunitario ha evolucionado para defender al organismo de parásitos intracelulares que destruyen a las células a las que infectan. Al morir las células infectadas dejarían entre sus restos antígenos relevantes del germen patógeno. Dependiendo del contexto microbiológico e inflamatorio, la presentación cruzada o subrogada puede dar lugar a una respuesta inmunitaria o a tolerancia antígeno específica. La inoculación de una proteína purificada sin adyuvante, daño celular o gérmenes tiende a inducir tolerancia, es decir falta de respuesta frente a ese antígeno. Además la relativa ineficiencia del fenómeno de presentación de antígenos traducidos por otra célula posibilita que antígenos de bajo ni-

vel de expresión puedan ser ignorados por el sistema inmunitario sin inducción de inmunidad ni tolerancia en lo que se ha dado en denominar ignorancia inmunológica⁶³.

DETECCIÓN DE PATRONES MOLECULARES VIRALES POR CÉLULAS DENDRÍTICAS ESPECIALIZADAS EN PRESENTACIÓN CRUZADA O SUBROGADA

La maduración de las CD es un programa de expresión génica cuyos productos determinan la capacidad de activar a linfocitos T y linfocitos NK. El programa madurativo puede ser inducido en respuesta a una lista de estímulos tanto microbianos

como proinflamatorios. Estos pueden incluir patrones moleculares asociados a gérmenes, citoquinas pro-inflamatorias (ej: TNF- α e IFN de tipo I), inmuno-complejos y señales moleculares liberadas o generadas durante un daño tisular⁶⁴⁻⁶⁶. Los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) quizá son los estímulos más potentes y su descubrimiento ha ofrecido la posibilidad de desarrollar nuevos adyuvantes para vacunas⁶⁴⁻⁶⁶. Estos PAMP son reconocidos por receptores del sistema inmune innato denominados receptores de reconocimiento de patrones (RRP), que incluyen lectinas tipo C de superficie (CLR), receptores tanto de superficie como endosómicos tipo Toll (TLR) y receptores citosólicos como el RIG-I, MDA-5 y NLR⁶⁴. Los receptores de reconocimiento de patrones moleculares de gérmenes se expresan en muchas células efectoras del sistema inmune innato, macrófagos, células dendríticas, y células B activadas, incluidas en el concepto de células presentadoras de antígeno³³. No se trata de receptores específicos de antígeno, ya que no presentan una distribución clonal⁶⁷, sino de detectores de la presencia de biomoléculas que denotan la presencia de gérmenes y la estirpe filogenética de los mismos.

Tras la infección de un virus, las células del sistema inmunitario tales como las CD y los macrófagos, detectan el ARN de doble cadena (dsRNA) viral a través de los receptores RLRs y TLR3⁶⁸. RIG-I y MDA5 pueden detectar los ácidos nucleicos de virus ARN en el citosol⁶⁸. RIG-I detecta características del ARN de varios virus pertenecientes a los géneros de paramixovirus, ortomixovirus, flavivirus y rhabdovirus y MDA5 detecta ARN de picornavirus y calicivirus^{69,70}. Tras la detección se activa un complejo con la proteína IPS-1 (también denominada MAVS) de la superficie mitocondrial y la activación de los factores IRF inductores de interferón tipo I, vía la tirosina quinasa TBK-1³² e IKK ϵ . TLR3 reconoce dsRNA en el interior de endosomas e inicia la transducción de señales a través de su dominio intracitoplasmático que interacciona con el adaptador TRIF^{69,70}.

El ácido polioinsínico-policitidílico (poly I:C) es un análogo de ARN de doble

cadena y el tratamiento de animales con poly I:C induce intensos efectos antivirales y antineoplásicos⁷¹, interpretados originalmente como el resultado de la producción de IFN- α . Las células dendríticas CD8 α^+ expresan los genes para IFN tipo I, IL-6, e IL-12p40 en respuesta a poly I:C. El poly I:C, actuando como una análogo de ARN viral, activa el eje RIG-I / IPS-1 en el citosol^{32,71}. Poly I:C es agonista tanto de TLR-3 como de RIG-I, de manera que puede inducir la maduración de CD tanto desde endosomas fagocíticos como desde el citoplasma^{32,70,71}. Dado que la misión fisiológica de los linfocitos T citotóxicos es la defensa frente a infecciones virales, parece lógico que la presentación cruzada se intensifique en presencia de ARN viral.

SUBPOBLACIONES DE CÉLULAS DENDRÍTICAS DE RATÓN ESPECIALIZADAS EN PRESENTACIÓN CRUZADA O SUBROGADA

Se reconocen tanto en ratón como en humano varias subpoblaciones de células dendríticas distinguibles por sus marcadores de superficie, su ontogenia y sus funciones⁷²⁻⁷⁴. En el bazo de ratón es posible realizar una división en dos subpoblaciones diferentes atendiendo al marcador CD8 α . De esta manera, las CD se pueden clasificar en dos grandes subgrupos con distintas funciones biológicas: CD8 α^+ /CD11c $^-$ y CD8 α^- /CD11c $^+$.

Las células dendríticas de la “familia CD8 α^+ ” representan aproximadamente el 20% de las CD convencionales del bazo en ratón⁷⁵. Existe evidencia experimental *in vivo* que indica que estas células captan material exógeno para presentarlo asociado a MHC de clase I, lo que permite respuestas T citotóxicas frente a virus y tumores^{72,74,76}. Asimismo, expresan receptores de membrana que les permiten internalizar eficientemente material de células muertas o en apoptosis^{77,78}. Como sucede con otras poblaciones de CD las células CD8 α^+ , en su estado inmaduro, expresan cantidades escasas de moléculas de co-estimulo, como CD80 y CD86⁷⁹.

A diferencia de los linfocitos T citotóxicos que expresan el dímero $CD8\alpha/CD8\beta$, estas células disponen del homodímero $CD8\alpha/CD8\alpha^{80}$, que es un co-receptor que interacciona con moléculas MHC de clase I pero su función en CD es desconocida y no se conserva en humanos.

En ratón se ha descrito la subpoblación $CD8\alpha^+$ localizada en sangre y en órganos linfoides secundarios y la subpoblación $CD103^+$ en la dermis^{75,81} (Fig. 2 y Tabla 1). Ambas poblaciones expresan marcadores comunes (tales como Clec9a) y dependen para su ontogenia del factor de transcripción Batf3^{82,83}. Los ratones modificados genéticamente que carecen de este factor de transcripción carecen de células dendríticas $CD8\alpha^+$ en el bazo y en los ganglios lin-

fáticos, mientras que los números de otros subtipos de CD se mantienen intactos. La ausencia de Batf3 conlleva que los ratones tengan una respuesta más débil frente a infecciones virales y una mayor incidencia de tumores espontáneos^{82,83}. Además de la necesidad del factor de transcripción Batf3 para la diferenciación de las CD de ratón, se ha observado que la carencia del factor de transcripción IRF-8 determina la ausencia en el ratón tanto de células dendríticas plasmocitoides como de células dendríticas $CD8\alpha^{84}$. Existe además una cepa de ratón llamada BXH2 que porta una mutación puntual en el gen de IRF-8 y que determina la ausencia de las células $CD8\alpha$, mientras que las CD plasmocitoides son aparentemente normales⁸⁵.

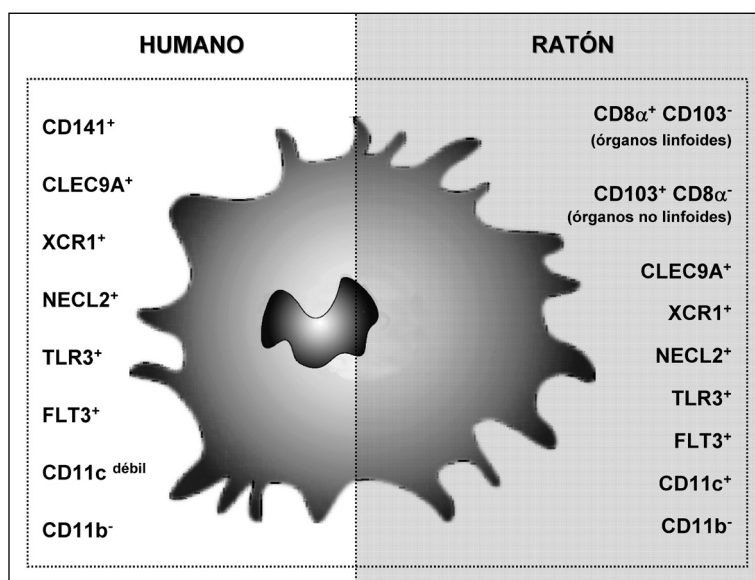


Figura 2. Comparación de los marcadores de células dendríticas especializadas en presentación cruzada o subrogada de ratón y humano.

Es muy sorprendente que las células $CD8\alpha^+$ de ratón residen en órganos linfoides sin patrullar los tejidos periféricos como la piel y las mucosas. El paradigma de la captura de antígeno en el tejido y subsecuente presentación linfocitaria en órganos linfoides

no parece por tanto posible con esta distribución tisular. Existe un debate en la comunidad científica sobre el mecanismo que hace llegar aquellos antígenos que van a ser presentados hasta el órgano linfoides secundario. Es posible que ocurra presen-

tación antigénica de segunda mano y que las células CD8 α^+ estén especializadas en presentar antígenos capturados por otras CD o macrófagos que sí provengan de focos inflamatorios^{86,87}. La función de estas células CD8 α^+ es crítica para la inmunización con conjugados de anticuerpos monoclonales frente a la proteína DEC-205 y antígenos modelo⁸⁸.

La expresión selectiva en la superficie celular de la lectina Clec9a en este subgrupo de células dendríticas ha permitido usar este receptor como diana para dirigir antígenos tumorales frente a estas subpoblaciones de dendríticas, resultando en una inducción muy eficiente de actividad citotóxica frente a antígenos modelo y frente a antígenos tumorales^{88,89}. La experimentación con este subtipo celular es difícil debido a la complejidad para purificarlas en número suficiente a partir de bazo de ratones. Es posible emplear una estrategia basada en la infusión de la citoquina sFlt-3L (*fms-related tyrosine kinase 3 ligand*) que permite expandir esta subpoblación en número suficiente de forma que se pueda purificar estas células por selección inmunomagnética para experimentar sobre ellas⁹⁰.

Una alternativa que permite estudiar este tipo de células dendríticas es el cultivo de suspensiones celulares de médula ósea con la citoquina sFlt-3L⁹¹. Aunque el sFlt-3L es la única citoquina exógena añadida al cultivo, la diferenciación depende de trazas de GM-CSF producido endógenamente⁹². Una fracción de las CD resultantes tienen propiedades funcionales similares a las células CD8 α^+ de bazo, aunque carecen de la expresión de CD8 α en su superficie. Estas CD generadas en los cultivos expresan altos niveles de Clec9A y niveles bajos de CD172a, en comparación con las células CD8 α^+ del bazo. La estimulación de estas células con ligandos de receptores *Toll-like* (TLR), previa a la captura antigénica, incrementa en gran medida la eficiencia de la presentación cruzada^{93,94}. Una serie de estudios publicados recientemente demuestran que los precursores circulantes

del linaje de las CD8 α^+ no están dotadas de la capacidad de realizar la presentación cruzada de antígenos y que dicha capacidad se adquiere en pasos posteriores del desarrollo una vez desplegadas en el tejido linfoides^{75,78}.

Por contraposición con el bazo, las células CD8 α^+ del timo representan la mayor parte de la población de dendríticas residentes en este órgano⁷⁵. Las células CD8 α^+ residentes en el timo expresan Clec9A, CD205, CD24, así como CD11b y CD172a a niveles bajos. También expresan bajos niveles de moléculas de co-estímulo y niveles moderados de MHC clase II. Sin embargo, difieren en que expresan establemente CD103⁹². La molécula CD103 es un receptor de "homing" a tejidos epiteliales^{81,83}. La importancia de la presentación cruzada en el timo es un tema en debate. Se puede especular que la captura y presentación de antígenos en restos apoptóticos de timocitos u otras células tímicas puede ser importante en fenómenos de selección negativa implicados en eliminar del repertorio de reconocimiento a linfocitos T citotóxicos con capacidad autorreactiva. No obstante, por el momento no se dispone de evidencia experimental.

El hecho de que las células de la "familia CD8 α^+ " sean aquellas que parecen tener más acentuada esta capacidad, no significa que las células CD8 α no sean capaces de realizar la presentación cruzada en ninguna circunstancia⁶². Existen estudios experimentales que indican que se puede conseguir presentación cruzada por parte de la subpoblación CD8 α mediante su activación a través de TLRs o FcR⁹⁵⁻⁹⁸ y se ha observado que son necesarias para la presentación cruzada de antígenos derivados de *Saccharomyces cerevisiae*⁹⁹ (Tabla 1).

Las células dendríticas CD11c⁺ derivadas de suspensiones de médula ósea en cultivos de diferenciación en presencia de GM-CSF son capaces de presentar antígenos proteicos o en cuerpos apoptóticos fagocitados a linfocitos T citotóxicos con efectos terapéuticos frente a tumores¹⁰⁰ (Tabla 1).

Tabla 1. Esquema de los diferentes subtipos de células dendríticas de ratón en bazo y piel y sus funciones en inmunidad. DC: células dendríticas; LC: células de Langerhans; cDC: células dendríticas convencionales; pDC: células dendríticas plasmocitoides; +/-: baja capacidad y sólo en ciertas situaciones; ++: alta capacidad.

Ratón						
Bazo				Piel (ejemplo de tejido periférico)		
cDCs			pDCs (CD11c ⁺ B220 ⁺ PDCA-1 ⁺)		LC (Langerina ⁺)	DC dermal
CD8α ⁺ CD4 ⁺ CD11b ⁺ CD205 ⁺	CD8α ⁺ CD4 ⁺ CD11b ⁺ CD205 ⁺	CD8α ⁺ CD4 ⁺ CD11b ⁺ CD205 ⁺	CD9 ⁺ Siglec ^{bajo}	CD9 Siglec ^{bajo}	CD11b ⁺ CD103 ⁺ CD172a ⁺ CD205 ⁺ Dectina-1 ⁺	CD11b ^{low} CD103 ⁺ CD172a ⁺ EpCAM ⁺
- Respuesta Th1 - Presentación subrogada	- Respuesta T <i>helper</i> - Activación células T CD4 ⁺	Respuesta T <i>helper</i>	Producción de IFN-α/β	Inducción de linfocitos T reguladores FoxP3 ⁺ CD4 ⁺	- Respuesta celular en la piel - Rechazo de injertos	Presentación subrogada
Capacidad de presentación subrogada						
++	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	++

Las células de Langerhans (Langerina⁺ CD11c⁺) en la piel están desplegadas en la epidermis donde pueden capturar antígenos y se sabe que son capaces de migrar a ganglios linfáticos con material celular endocitado. Existen estudios experimentales en los que estas células demuestran capacidad de presentar a linfocitos T citotóxicos en particular en infecciones experimentales con virus HSV-1⁸¹ (Tabla 1).

Muy recientemente se ha descrito un ratón transgénico *Knock-in* que va a ser de extraordinaria utilidad en el esclarecimiento de la fisiología de estas células profesionales de la presentación cruzada. En estos ratones se ha insertado en el locus del receptor de quimioquinas XCR1 el gen de una proteína fluorescente fusionada con el receptor de toxina diftérica. Este ratón permite realizar experimentos de seguimiento de estas poblaciones celulares que son selectivamente fluorescentes y deplecionar transitoriamente al ratón de estas poblaciones celulares mediante la administración de toxina diftérica a bajas dosis. Los experimentos realizados en estos ratones tras depleción confirman que desaparecen selectivamente durante 2-4 días las células CD8α⁺ del bazo/ganglio y las células CD103⁺ de la piel. En esas condiciones se confirma

el papel crítico y no redundante de estas CD en la inducción de linfocitos T citotóxicos¹⁰¹.

CÉLULAS DENDRÍTICAS HUMANAS ESPECIALIZADAS EN PRESENTACIÓN CRUZADA O SUBROGADA

Durante casi una década, el problema ha sido que no era posible identificar una población de células dendríticas humanas con características similares a las de las células dendríticas CD8α⁺ de ratón, ya que no existe una población que co-exprese CD8α y no es fácil obtener órganos linfoides humanos con viabilidad celular. Sin embargo, el trabajo del Dr. David Sancho, en el grupo del Dr. Caetano Reis e Sousa, permitió demostrar que existe una población con un perfil transcriptómico similar en humanos y en ratón^{89,102}. Estos investigadores partieron de comparaciones transcriptómicas entre células CD8α⁺ de ratón con el resto de poblaciones dendríticas, identificando genes diferencialmente expresados. De entre estos genes, dos de ellos destacaban, puesto que debían expresarse en la membrana y era posible reconocerlos me-

diante anticuerpos monoclonales. Uno de ellos era la lectina tipo C, Clec9A (DNCR-1). Obteniendo anticuerpos anti-Clec9A fue posible identificar esta subpoblación en humanos y demostrar que en sangre periférica coincide con la previamente descrita por expresar el marcador BDCA-3 (CD141 o trombomodulina)¹⁰³.

Recientemente, se ha confirmado que las células dendríticas BDCA-3⁺ humanas son funcionalmente equivalentes a las de la "familia CD8 α ⁺" de ratón^{102,104-107}. En una primera descripción funcional se muestra que son superiores en su capacidad de presentación cruzada y en la generación de respuestas efectoras T CD8⁺ frente a antígenos exógenos^{102,106,107}. Las células BDCA-3⁺ humanas comparten las siguientes propiedades con las células CD8 α ⁺ de ratón:

1. Expresan un patrón común de receptores: comparten la expresión de Clec9a (receptor de la familia 9 del dominio de tipo C de lectina)^{102,108}, Necl2 (CADM1 o molécula 1 de adhesión celular)^{102,107}, TLR-3¹⁰⁷ y el receptor de quimioquinas XCR1^{104,109} (Fig. 2).

2. Dependen de los mismos factores de transcripción (Batf3, IRF-8).

3. Están especializadas en la captación de células necróticas.

4. Son productoras de IL-12 e IFN α ¹¹⁰.

5. Tienen la capacidad de presentación cruzada o subrogada, lo que resulta potencialmente en la activación CTL.

La expresión selectiva del receptor de quimioquinas XCR1 sugiere un compartimento sumamente interesante en migración^{106,109}. Solamente existe un ligando conocido, la quimioquina XCL1, que es producida por linfocitos T CD8 activados. De esta manera es muy posible que ambas poblaciones celulares estén hechas para encontrarse en el tumultuoso órgano linfóide en el que se mueven, de forma que la probabilidad de ejercer presentaciones cruzadas o subrogadas de antígeno es posiblemente superior a lo predecible por la escasez relativa de ambos subtipos celulares. Sin embargo, la capacidad para activar CTL de las células BDCA-3⁺ resulta quizá menos notoria que las células CD8 α ⁺ de ratón y ne-

cesitan ser inducidas por ligandos de TLR, como poly I:C^{102,111}. Las células BDCA-3⁺ de sangre periférica podrían representar un equivalente de un linaje temprano de las células CD8 α ⁺ de ratón, para las que son necesarios factores adicionales para inducir eficientemente la capacidad de realizar la presentación cruzada de antígenos¹¹². En trabajos posteriores se han identificado combinaciones de factores de crecimiento que permiten enriquecer en cultivo estas células pero con un bajo rendimiento/pureza y elevada complejidad metodológica^{113,114}.

Existe controversia sobre si, en ausencia de activación, la población BDCA-1⁺, las pDC y las LC también son capaces de realizar la presentación cruzada de antígenos en el contexto de proteínas solubles. Todas estas poblaciones de CD tienen la capacidad de exportar proteínas internalizadas al citoplasma, paso clave para la presentación cruzada⁵⁰. Estudios comparativos de células BDCA-1⁺ y BDCA-3⁺ aisladas de sangre periférica y de amígdalas demuestran que ambas tienen la capacidad de presentar antígeno exógeno a clones de linfocitos T en cultivo¹¹³. Es más cuestionable si las células BDCA-1⁺ son capaces de direccionar los antígenos internalizados a partir de restos celulares a endosomas tempranos y si esto permite su presentación cruzada o subrogada (Tabla 2).

Las células BDCA-3⁺ son las únicas que presentan la molécula Clec9A en su superficie, que resulta fundamental en el reconocimiento de las células necróticas para que pueda darse la presentación cruzada. De hecho, David Sancho pudo demostrar que el sistema Clec9A es necesario y no redundante para la captación de antígenos a partir de células necróticas en ratón¹¹⁵. Así, el receptor es crítico para poder presentar antígenos virales presentes en cuerpos apoptóticos como se demuestra en un sistema de infección por virus vacinia^{116,117}.

La endocitosis mediada por receptores puede ser también realizada a través de otras lectinas de tipo C. A este grupo pertenecen DEC-205, el receptor de manosa (MR), la dectina-1, DC-SIGN y DCIR^{28,118}.

Tabla 2. Esquema de los diferentes subtipos de células dendríticas de humano en sangre y piel y sus funciones en inmunidad. LC: células de Langerhans; cDC: células dendríticas convencionales; pDC: células dendríticas plasmocitoides; +/-: baja capacidad y sólo en ciertas situaciones; ++: alta capacidad.

Humano							
Sangre				Piel (ejemplo de tejido periférico)			
cDCs (CD11c ⁺)			pDCs (CD123 ⁺ BDCA-2/4 ⁺)		LC Epidermis	Dermis	Dermis
BDCA-1 ⁺	BDCA-3 ⁺	CD16 ⁺	CD2 ^{alto}	CD2 ^{bajo}	Langerina ⁺	CD14 ⁺	CD1a ⁺
- Activación células T CD4 ⁺	- Activación células T CD8 ⁺	- Respuesta inflamatoria	- Respuesta antiviral	- Respuesta antiviral	- Activación células T CD8 ⁺	- Diferenciación células T CD4 ⁺	Activación células T CD8 ⁺
- Presentación subrogada?	- Presentación subrogada	- Respuesta T <i>helper</i>	- Producción de IFN- α/β	- Producción de IFN- α/β	- Diferenciación células T CD4 ⁺ en Th2	- Inmunidad humoral	
Capacidad de presentación subrogada							
+/-	++	+/-	+/-	+/-	++	+/-	+/-

Steinman y su grupo identificaron que la función presentadora de antígeno de las CD estaba asociada con la expresión de DEC-205 (CD205), una proteína de membrana homóloga al receptor de manosa de macrófago, implicada en endocitosis¹¹⁹. La unión de la proteína a DEC-205 resulta en una rápida internalización a endosomas ricos en MHC de clase II. El papel de DEC-205 en la captación de antígeno y presentación cruzada se ha demostrado en CD de ratón¹²⁰. DEC-205 se expresa en muchas subpoblaciones de CD pero cuando se hace diana un antígeno a DEC-205 mediante inmuconjugados la única subpoblación que inmuniza a linfocitos T CD8⁺ es la subpoblación CD8 α ⁺. Es objeto de debate si estas observaciones dependen del hecho de que DEC-205 se internaliza a endosomas tempranos estables¹¹⁴. De hecho, las células BDCA-3⁺ tienen una mayor capacidad de realizar la presentación cruzada de aquellos antígenos dirigidos a endosomas tempranos, como se ha podido observar al utilizar un anticuerpo que señalice a través de DEC-205 conjugado con el antígeno¹¹⁴.

DC-SIGN fue originalmente identificado como un receptor de ICAM-3, que producía la proliferación de células T¹²¹. Este receptor es capaz de interactuar con muchos patógenos, incluidos HIV, *Mycobacterium* y *E coli*¹²². Su papel en internalización de an-

tígeno es objeto de controversia y no existe evidencia de su implicación en presentación cruzada.

ESTRATEGIAS PARA LA EXPLOTACIÓN TERAPÉUTICA DE CÉLULAS DENDRÍTICAS PROFESIONALES DE LA PRESENTACIÓN CRUZADA O SUBROGADA

Las estrategias de inmunoterapia están comenzando a demostrar eficacia parcial en el tratamiento de pacientes con cáncer¹²³⁻¹²⁵. La inmunoterapia con células dendríticas se basa en aprovechar las propiedades de estas células para presentar antígeno de forma inmunogénica y así reprogramar y activar la respuesta de linfocitos T con capacidad tumoricida^{123,124,126}. Actualmente, la tecnología más extendida de inmunoterapia frente al cáncer con células dendríticas consiste en inocular células extraídas del paciente, cultivadas *in vitro*, cargadas con antígenos tumorales relevantes, activadas (maduradas) para ser pro-inmunogénicas y reinfundidas en el paciente para inducir una respuesta inmune antitumoral.

El uso de la subpoblación de dendríticas humanas BDCA-3⁺, hasta ahora pobremente explorada en clínica, podría resul-

tar en una respuesta efectora T citotóxica superior, como se ha demostrado con sus equivalentes murinos (Alfaro y col, manuscrito en preparación). Sin embargo por el momento no se ha podido generar ningún protocolo eficiente para separar o diferenciar con rendimiento razonable estas células a partir de sus precursores, aunque se ha realizado como ya hemos referido algún intento con escaso rendimiento^{113,114}.

La eficacia en modelos de ratón y los conocimientos disponibles sobre las propiedades funcionales de esta subpoblación de células dendríticas indica que son las más apropiadas para la inducción de respuestas T citotóxicas frente a tumores y que por tanto resultarían en estrategias terapéuticas más eficaces. Existen dos aproximaciones posibles para inducir la respuesta a través de estas células dendríticas: (i) intentar dirigir antígenos al interior de estas células mediante proteínas de fusión diana. Esta aproximación es prometedora pero, por el momento, presenta la dificultad de identificar que neoantígenos tumorales se pueden utilizar para la inducción de inmunidad antitumoral eficiente y (ii) proceder al aislamiento y manipulación de estas células *ex vivo*. Las células se purifican de los pacientes, se cargan con antígeno tumoral para ser activadas (maduradas) y posteriormente se inyectarían por vía percutánea, intravenosa o en el interior de ganglios linfáticos localizados mediante ecografía.

La primera estrategia consiste en dirigir antígenos a receptores de la superficie celular específicos de las CD eficientes en captar antígeno para su presentación cruzada (DEC-205, CLEC9A). Por un lado, sabemos que la inmunización con antígenos dirigidos a la población homóloga CD8 α^+ de ratón es una estrategia efectiva para obtener inmunidad anti-tumoral¹²⁷. La cuestión ahora es si se pueden realizar enfoques parecidos para dirigir antígenos al homólogo humano, alcanzando resultados terapéuticos significativos.

La segunda estrategia consiste en la selección de las células BDCA-3 $^+$ y su posterior manipulación *ex vivo*. Los pacientes se someterían a una leucocitoaféresis. Sus CD son separadas mediante inmunoselección,

se cultivan en medios que contengan ciertos antígenos de interés y posteriormente se inyectan de nuevo al paciente. De la misma forma cabe mencionar el uso de sFLT-3L por su capacidad de multiplicar el número de células disponibles para su posterior aislamiento y manipulación, por lo que podría generarse un mayor número de células movilizadas con este método, lo que puede ser técnicamente necesario para hacer viable la estrategia. La inyección intratumoral de estas células es también una estrategia con posibilidades de éxito, sobretodo si se provoca la muerte de células malignas en el territorio de la inyección⁸⁷. Parece plausible que las células dendríticas profesionales de la presentación cruzada elegirán, entre el debris celular, los antígenos tumorales más susceptibles de ser presentados¹²⁸.

El tipo de agonista de TLR suministrado para inducir maduración también desempeña un papel muy importante en la calidad y el tipo de respuesta inmunitaria generada. Por ejemplo, la estimulación tanto con TLR3, TLR7 o TLR9 induce la producción de IFN tipo I, que permite mejorar aún más la presentación cruzada por parte de las CD¹²⁹. Del mismo modo, la estimulación con ligandos para TLR3, TLR4, TLR7 y TLR9 induce la producción de IL-12p70³³. La estimulación de las células dendríticas mediante múltiples tipos de agonistas de TLR, en combinación unos con otros, parece ser uno de los medios más eficientes en la inducción de la maduración y en la estimulación de la presentación cruzada.

Es probable que la próxima generación de vacunas orientadas a conseguir linfocitos T citotóxicos explote las funciones especializadas de las células BDCA3 $^+$ y posiblemente incorpore formulaciones con diferentes tipos de ligandos de TLR como adyuvantes moleculares. El objetivo es una presentación cruzada muy eficiente inmunizando frente a los antígenos tumorales relevantes.

BIBLIOGRAFÍA

1. STEINMAN RM, COHN ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. J Exp Med 1973; 137: 1142-1162.

2. STEINMAN RM, COHN ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. II. Functional properties in vitro. *J Exp Med* 1974; 139: 380-397.
3. STEINMAN RM, LUSTIG DS, COHN ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. 3. Functional properties in vivo. *J Exp Med* 1974; 139: 1431-1445.
4. LANZAVECCHIA A, SALLUSTO F, RALPH M, STEINMAN 1943-2011. *Cell* 2011; 147: 1216-1217.
5. INABA K. A TRIBUTE TO RALPH M. STEINMAN. *Int Immunol* 2012; 24: 1-3.
6. STEINMAN RM. Dendritic cells: understanding immunogenicity. *Eur J Immunol* 2007; 37 Suppl 1: S53-60.
7. ARDAVIN C. Origin, precursors and differentiation of mouse dendritic cells. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 582-5890.
8. STEINMAN RM. Decisions about dendritic cells: past, present, and future. *Annu Rev Immunol* 2012; 30: 1-22.
9. BANCHEREAU J, STEINMAN RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998; 392: 245-252.
10. STEINMAN RM, HAWIGER D, LIU K, BONIFAZ L, BONNAY D, MAHNKE K et al. Dendritic cell function in vivo during the steady state: a role in peripheral tolerance. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 987: 15-25.
11. DZOPALIC T, RAJKOVIC I, DRAGICEVIC A, Colic M. The response of human dendritic cells to co-ligation of pattern-recognition receptors. *Immunol Res* 2012; 52: 20-33.
12. LIU YJ, KANZLER H, SOUMELIS V, GILLET M. Dendritic cell lineage, plasticity and cross-regulation. *Nat Immunol* 2001; 2: 585-589.
13. UNDERHILL DM, GOODRIDGE HS. Information processing during phagocytosis. *Nat Rev Immunol* 2012; 12: 492-502.
14. HOPKINS RA, CONNOLLY JE. The specialized roles of immature and mature dendritic cells in antigen cross-presentation. *Immunol Res* 2012; 53: 91-107.
15. HEATH WR, VILLADANGOS JA. No driving without a license. *Nat Immunol* 2005; 6: 125-126.
16. HESPEL C, MOSER M. Role of inflammatory dendritic cells in innate and adaptive immunity. *Eur J Immunol* 2012; 42: 2535-2543.
17. MACAGNO A, NAPOLITANI G, LANZAVECCHIA A, SALLUSTO F. Duration, combination and timing: the signal integration model of dendritic cell activation. *Trends Immunol* 2007; 28: 227-233.
18. MULLER JR, WALDMANN TA, KRULAK MJ, DUBOIS S. Paracrine and transpresentation functions of IL-15 are mediated by diverse splice versions of IL-15 α in human monocytes and dendritic cells. *J Biol Chem* 2012; 287: 40328-40338.
19. STEEL JC, WALDMANN TA, MORRIS JC. Interleukin-15 biology and its therapeutic implications in cancer. *Trends Pharmacol Sci* 2012; 33: 35-41.
20. HERVAS-STUBBS S, PEREZ-GRACIA JL, ROUZAUT A, SANMAMED MF, LE BON A, MELERO I. Direct effects of type I interferons on cells of the immune system. *Clin Cancer Res* 2011; 17: 2619-2627.
21. HERVAS-STUBBS S, MANCHENO U, RIEZU-BOJ JL, LARRAGA A, OCHOA MC, ALIGNANI D et al. CD8 T cell priming in the presence of IFN- α renders CTLs with improved responsiveness to homeostatic cytokines and recall antigens: important traits for adoptive T cell therapy. *J Immunol* 2012; 189: 3299-3310.
22. ZELANTE T, FRIC J, WONG AY, Ricciardi-Castagnoli P. Interleukin-2 production by dendritic cells and its immuno-regulatory functions. *Front Immunol* 2012; 3: 161.
23. REIS E SOUSA C. Activation of dendritic cells: translating innate into adaptive immunity. *Curr Opin Immunol* 2004; 16: 21-25.
24. DIEU-NOSJEAN MC, VICARI A, LEBECQUE S, CAUX C. Regulation of dendritic cell trafficking: a process that involves the participation of selective chemokines. *J Leukoc Biol* 1999; 66: 252-262.
25. FORSTER R, DAVALOS-MISLITZ AC, ROT A. CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance. *Nat Rev Immunol* 2008; 8: 362-371.
26. ROUZAUT A, GARASA S, TEJEIRA A, GONZALEZ I, MARTINEZ-FORERO I, SUAREZ N et al. Dendritic cells adhere to and transmigrate across lymphatic endothelium in response to IFN- α . *Eur J Immunol* 2010; 40: 3054-3063.
27. TEJEIRA A, PALAZON A, GARASA S, MARRE D, AUBA C, ROGEL A et al. CD137 on inflamed lymphatic endothelial cells enhances CCL21-guided migration of dendritic cells. *FASEB J* 2012; 26: 3380-3392.
28. GORDON S. Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. *Cell* 2002; 111: 927-930.
29. MATZINGER P. An innate sense of danger. *Semin Immunol* 1998; 10: 399-415.
30. MATZINGER P. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol* 1994; 12: 991-1045.
31. REID SD, PENNA G, ADORINI L. The control of T cell responses by dendritic cell subsets. *Curr Opin Immunol* 2000; 12: 114-121.
32. ZOU J, KAWAI T, TSUCHIDA T, KOZAKI T, TANAKA H, SHIN KS et al. Poly IC triggers a cathepsin D- and IPS-1-dependent pathway to enhance cytokine production and mediate dendritic cell necroptosis. *Immunity* 2013; 38: 717-728.

33. JANEWAY CA, JR., MEDZHITOV R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 2002; 20: 197-216.
34. SPORRI R, REIS E SOUSA C. Inflammatory mediators are insufficient for full dendritic cell activation and promote expansion of CD4⁺ T cell populations lacking helper function. *Nat Immunol* 2005; 6: 163-170.
35. SALLUSTO F, LANZAVECCHIA A. The instructive role of dendritic cells on T-cell responses. *Arthritis Res* 2002; 4 Suppl 3: S127-132.
36. ROMANI N, GRUNER S, BRANG D, KAMPGEN E, LENZ A, TROCKENBACHER B et al. Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J Exp Med* 1994; 180: 83-93.
37. INABA K, INABA M, ROMANI N, AYA H, DEGUCHI M, IKEHARA S et al. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* 1992; 176: 1693-1702.
38. MAZZOLINI G, ALFARO C, SANGRO B, FELJOO E, RUIZ J, BENITO A et al. Intratumoral injection of dendritic cells engineered to secrete interleukin-12 by recombinant adenovirus in patients with metastatic gastrointestinal carcinomas. *J Clin Oncol* 2005; 23: 999-1010.
39. SANTINI SM, DI PUCCHIO T, LAPENTA C, PARLATO S, LOGOZZI M, BELARDELLI F. A new type I IFN-mediated pathway for the rapid differentiation of monocytes into highly active dendritic cells. *Stem Cells* 2003; 21: 357-362.
40. MOHAMADZADEH M, BERARD F, ESSERT G, CHALOUNI C, PULENDRAN B, DAVOUST J et al. Interleukin 15 skews monocyte differentiation into dendritic cells with features of Langerhans cells. *J Exp Med* 2001; 194: 1013-1020.
41. STEINMAN RM, NUSSENZWEIG MC. Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 351-358.
42. ITO T, AMAKAWA R, INABA M, HORI T, OTA M, NAKAMURA K et al. Plasmacytoid dendritic cells regulate Th cell responses through OX40 ligand and type I IFNs. *J Immunol* 2004; 172: 4253-4259.
43. BLOM B, HO S, ANTONENKO S, LIU YJ. Generation of interferon alpha-producing predendritic cell (Pre-DC)2 from human CD34(+) hematopoietic stem cells. *J Exp Med* 2000; 192: 1785-1796.
44. DONAGHY H, GAZZARD B, GOTCH F, PATTERSON S. Dysfunction and infection of freshly isolated blood myeloid and plasmacytoid dendritic cells in patients infected with HIV-1. *Blood* 2003; 101: 4505-4511.
45. COLONNA M, TRINCHIERI G, LIU YJ. Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nat Immunol* 2004; 5: 1219-1226.
46. LIU YJ. IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annu Rev Immunol* 2005; 23: 275-306.
47. REIZIS B, BUNIN A, GHOSH HS, LEWIS KL, SISIRAK V. Plasmacytoid dendritic cells: recent progress and open questions. *Annu Rev Immunol* 2011; 29: 163-183.
48. TEL J, SCHREIBELT G, SITTIG SP, MATHAN TS, BUSCHOW SI, CRUZ LJ et al. Human plasmacytoid dendritic cells efficiently cross-present exogenous Ags to CD8⁺ T cells despite lower Ag uptake than myeloid dendritic cell subsets. *Blood* 2013; 121: 459-467.
49. TEL J, AARNTZEN EH, BABA T, SCHREIBELT G, SCHULTE BM, BENITEZ-RIBAS D et al. Natural human plasmacytoid dendritic cells induce antigen-specific T-cell responses in melanoma patients. *Cancer Res* 2013; 73: 1063-1075.
50. JOFFRE OP, SEGURA E, SAVINA A, AMIGORENA S. Cross-presentation by dendritic cells. *Nat Rev Immunol* 2012; 12: 557-569.
51. SEGURA E, VILLADANGOS JA. A modular and combinatorial view of the antigen cross-presentation pathway in dendritic cells. *Traffic* 2011; 12: 1677-1685.
52. MANTEGAZZA AR, MAGALHAES JG, AMIGORENA S, MARKS MS. Presentation of phagocytosed antigens by MHC class I and II. *Traffic* 2013; 14: 135-152.
53. HEGDE RS, PLOEGH HL. Quality and quantity control at the endoplasmic reticulum. *Curr Opin Cell Biol* 2010; 22: 437-446.
54. SCHULZE MS, WUCHERPFENNIG KW. The mechanism of HLA-DM induced peptide exchange in the MHC class II antigen presentation pathway. *Curr Opin Immunol* 2012; 24: 105-111.
55. BEVAN MJ. Cross-priming for a secondary cytotoxic response to minor H antigens with H-2 congenic cells which do not cross-react in the cytotoxic assay. *J Exp Med* 1976; 143: 1283-1288.
56. BEVAN MJ. Minor H antigens introduced on H-2 different stimulating cells cross-react at the cytotoxic T cell level during in vivo priming. *J Immunol* 1976; 117: 2233-2238.
57. DRESCH C, LEVERRIER Y, MARVEL J, SHORTMAN K. Development of antigen cross-presentation capacity in dendritic cells. *Trends Immunol* 2012; 33: 381-388.
58. RESTIFO NP, DUDLEY ME, ROSENBERG SA. Adoptive immunotherapy for cancer: harnessing the T cell response. *Nat Rev Immunol* 2012; 12: 269-281.

59. CEBRIAN I, VISENTIN G, BLANCHARD N, JOUVE M, BOBARD A, MOITA C et al. Sec22b regulates phagosomal maturation and antigen crosspresentation by dendritic cells. *Cell* 2011; 147: 1355-1368.
60. LIN ML, ZHAN Y, PROIETTO AI, PRATO S, WU L, HEATH WR et al. Selective suicide of cross-presenting CD8+ dendritic cells by cytochrome c injection shows functional heterogeneity within this subset. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 3029-3034.
61. DANI A, CHAUDHRY A, MUKHERJEE P, RAJAGOPAL D, BHATIA S, GEORGE A et al. The pathway for MHCII-mediated presentation of endogenous proteins involves peptide transport to the endo-lysosomal compartment. *J Cell Sci* 2004; 117: 4219-4230.
62. McDONNELL AM, ROBINSON BW, CURRIE AJ. Tumor antigen cross-presentation and the dendritic cell: where it all begins? *Clin Dev Immunol* 2010; 2010: 539519.
63. MELERO I, BACH N, CHEN L. Costimulation, tolerance and ignorance of cytolytic T LYMPHOCYTES in immune responses to tumor antigens. *Life Sci* 1997; 60: 2035-2041.
64. KANZLER H, BARRAT FJ, HESSEL EM, COFFMAN RL. Therapeutic targeting of innate immunity with Toll-like receptor agonists and antagonists. *Nat Med* 2007; 13: 552-559.
65. PALM NW, MEDZHITOV R. Pattern recognition receptors and control of adaptive immunity. *Immunol Rev* 2009; 227: 221-233.
66. COFFMAN RL, SHER A, SEDER RA. Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work. *Immunology* 2010; 33: 492-503.
67. MEDZHITOV R, JANEWAY CA Jr. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* 1997; 91: 295-298.
68. KAWAI T, AKIRA S. Toll-like receptor and RIG-I-like receptor signaling. *Ann N Y Acad Sci* 2008; 1143: 1-20.
69. BARRAL PM, SARKAR D, SU ZZ, BARBER GN, DESALLE R, RACANELLO VR et al. Functions of the cytoplasmic RNA sensors RIG-I and MDA-5: key regulators of innate immunity. *Pharmacol Ther* 2009; 124: 219-234.
70. NAKHAEI P, GENIN P, CIVAS A, HISCOTT J. RIG-I-like receptors: sensing and responding to RNA virus infection. *Semin Immunol* 2009; 21: 215-222.
71. NICODEMUS CF, BEREK JS. TLR3 agonists as immunotherapeutic agents. *Immunotherapy* 2010; 2: 137-140.
72. HEATH WR, CARBONE FR. Dendritic cell subsets in primary and secondary T cell responses at body surfaces. *Nat Immunol* 2009; 10: 1237-1244.
73. MERAD M, MANZ MG. Dendritic cell homeostasis. *Blood* 2009; 113: 3418-3427.
74. VILLADANGOS JA, SCHNORRER P. Intrinsic and cooperative antigen-presenting functions of dendritic-cell subsets in vivo. *Nat Rev Immunol* 2007; 7: 543-555.
75. SHORTMAN K, HEATH WR. The CD8+ dendritic cell subset. *Immunol Rev* 2010; 234: 18-31.
76. DUDZIAK D, KAMPHORST AO, HEIDKAMP GF, BUCHHOLZ VR, TRUMPFHELLER C, YAMAZAKI S et al. Differential antigen processing by dendritic cell subsets in vivo. *Science* 2007; 315: 107-111.
77. IYODA T, SHIMOYAMA S, LIU K, OMATSU Y, AKIYAMA Y, MAEDA Y et al. The CD8+ dendritic cell subset selectively endocytoses dying cells in culture and in vivo. *J Exp Med* 2002; 195: 1289-1302.
78. SCHNORRER P, BEHRENS GM, WILSON NS, POOLEY JL, SMITH CM, EL-SUKKARI D et al. The dominant role of CD8+ dendritic cells in cross-presentation is not dictated by antigen capture. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 10729-10734.
79. WILSON NS, EL-SUKKARI D, BELZ GT, SMITH CM, STEPTOE RJ, HEATH WR et al. Most lymphoid organ dendritic cell types are phenotypically and functionally immature. *Blood* 2003; 102: 2187-2194.
80. HONG L, WEBB TJ, WILKES DS. Dendritic cell-T cell interactions: CD8 alpha alpha expressed on dendritic cells regulates T cell proliferation. *Immunol Lett* 2007; 108: 174-178.
81. BEDOUI S, WHITNEY PG, WATTHMAN J, EIDSMO L, WAKIM L, CAMINSCHI I et al. Cross-presentation of viral and self antigens by skin-derived CD103+ dendritic cells. *Nat Immunol* 2009; 10: 488-495.
82. HILDNER K, EDELSON BT, PURTHA WE, DIAMOND M, MATSUSHITA H, KOHYAMA M et al. Batf3 deficiency reveals a critical role for CD8alpha+ dendritic cells in cytotoxic T cell immunity. *Science* 2008; 322: 1097-1100.
83. EDELSON BT, KC W, JUANG R, KOHYAMA M, BENOIT LA, KLEKOTKA PA et al. Peripheral CD103+ dendritic cells form a unified subset developmentally related to CD8alpha+ conventional dendritic cells. *J Exp Med* 2010; 207: 823-836.
84. SCHIAVONI G, MATTEI F, SESTILI P, BORGHI P, VENDITTI M, MORSE HC, 3RD et al. ICSBP is essential for the development of mouse type I interferon-producing cells and for the generation and activation of CD8alpha(+) dendritic cells. *J Exp Med* 2002; 196: 1415-1425.
85. TAILOR P, TAMURA T, MORSE HC, 3RD, OZATO K. The BXH2 mutation in IRF8 differentially impairs dendritic cell subset development in the mouse. *Blood* 2008; 111: 1942-1945.

86. ARINA A, TIRAPU I, ALFARO C, RODRIGUEZ-CALVILLO M, MAZZOLINI G, INOGES S et al. Clinical implications of antigen transfer mechanisms from malignant to dendritic cells: exploiting cross-priming. *Exp Hematol* 2002; 30: 1355-1364.
87. MELERO I, ARINA A, MURILLO O, DUBROT J, ALFARO C, PEREZ-GRACIA JL et al. Immunogenic cell death and cross-priming are reaching the clinical immunotherapy arena. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 2385-2689.
88. IDOYAGA J, LUBKIN A, FIORESE C, LAHOUD MH, CAMINSCHI I, HUANG Y et al. Comparable T helper 1 (Th1) and CD8 T-cell immunity by targeting HIV gag p24 to CD8 dendritic cells within antibodies to Langerin, DEC205, and Clec9A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108: 2384-2389.
89. SANCHEZ D, MOURAO-SA D, JOFFRE OP, SCHULZ O, ROGERS NC, PENNINGTON DJ et al. Tumor therapy in mice via antigen targeting to a novel, DC-restricted C-type lectin. *J Clin Invest* 2008; 118: 2098-2110.
90. MILLER G, PILLARISETTY VG, SHAH AB, LAHRS S, DEMATTEO RP. Murine Flt3 ligand expands distinct dendritic cells with both tolerogenic and immunogenic properties. *J Immunol* 2003; 170: 3554-3564.
91. NAIK SH, PROIETTO AI, WILSON NS, DAKIC A, SCHNORRER P, FUCHSBERGER M et al. Cutting edge: generation of splenic CD8+ and CD8- dendritic cell equivalents in Fms-like tyrosine kinase 3 ligand bone marrow cultures. *J Immunol* 2005; 174: 6592-6597.
92. SATHE P, POOLEY J, VREMEC D, MINTERN J, JIN JO, WU L et al. The acquisition of antigen cross-presentation function by newly formed dendritic cells. *J Immunol* 2011; 186: 5184-5192.
93. DE BRITO C, TOMKOWIAK M, GHITTONI R, CAUX C, LEVERRIER Y, MARVEL J. CpG promotes cross-presentation of dead cell-associated antigens by pre-CD8alpha+ dendritic cells. *J Immunol* 2011; 186: 1503-1511.
94. KURTS C, ROBINSON BW, KNOLLE PA. Cross-priming in health and disease. *Nat Rev Immunol* 2010; 10: 403-414.
95. POOLEY JL, HEATH WR, SHORTMAN K. Cutting edge: intravenous soluble antigen is presented to CD4 T cells by CD8- dendritic cells, but cross-presented to CD8 T cells by CD8+ dendritic cells. *J Immunol* 2001; 166: 5327-5330.
96. DEN HAAN JM, BEVAN MJ. Constitutive versus activation-dependent cross-presentation of immune complexes by CD8(+) and CD8(-) dendritic cells in vivo. *J Exp Med* 2002; 196: 817-827.
97. MORON G, RUEDA P, CASAL I, LECLERC C. CD8alpha-CD11b+ dendritic cells present exogenous virus-like particles to CD8+ T cells and subsequently express CD8alpha and CD205 molecules. *J Exp Med* 2002; 195: 1233-1245.
98. RUEDL C, STORNI T, LECHNER F, BACHI T, BACHMANN MF. Cross-presentation of virus-like particles by skin-derived CD8(-) dendritic cells: a dispensable role for TAP. *Eur J Immunol* 2002; 32: 818-825.
99. BACKER R, van Leeuwen F, Kraal G, den Haan JM. CD8- dendritic cells preferentially cross-present *Saccharomyces cerevisiae* antigens. *Eur J Immunol* 2008; 38: 370-380.
100. ALFARO C, PÉREZ-GRACIA JL, SUAREZ N, RODRÍGUEZ J, FERNÁNDEZ DE SANMAMED M, SANGRO B et al. Pilot clinical trial of type 1 dendritic cells loaded with autologous tumor lysates combined with GM-CSF, pegylated IFN, and cyclophosphamide for metastatic cancer patients. *J Immunol* 2011; 187: 6130-6142.
101. YAMAZAKI C, SUGIYAMA M, OHTA T, HEMMI H, HAMADA E, SASAKI I et al. Critical Roles of a Dendritic Cell Subset Expressing a Chemokine Receptor, XCR1. *J Immunol* 2013; 190: 6071-6082.
102. POULIN LF, SALIO M, GRIESSINGER E, ANJOS-AFONSO F, CRACIUN L, CHEN JL, et al. Characterization of human DNGR-1+ BDCA3+ leukocytes as putative equivalents of mouse CD8alpha+ dendritic cells. *J Exp Med* 2010; 207: 1261-1271.
103. DZIOBEK A, FUCHS A, SCHMIDT P, CREMER S, ZYSK M, MILTENYI S et al. BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. *J Immunol* 2000; 165: 6037-6046.
104. BACHEM A, GUTTLER S, HARTUNG E, EBSTEIN F, SCHAEFER M, TANNERT A et al. Superior antigen cross-presentation and XCR1 expression define human CD11c+CD141+ cells as homologues of mouse CD8+ dendritic cells. *J Exp Med* 2010; 207: 1273-1281.
105. CONTRERAS V, URIEN C, GUITON R, ALEXANDRE Y, VU MANH TP, ANDRIEU T et al. Existence of CD8alpha-like dendritic cells with a conserved functional specialization and a common molecular signature in distant mammalian species. *J Immunol* 2010; 185: 3313-3325.
106. CROZAT K, GUITON R, CONTRERAS V, FEUILLET V, DUVERTRE CA, VENTRE E et al. The XC chemokine receptor 1 is a conserved selective marker of mammalian cells homologous to mouse CD8alpha+ dendritic cells. *J Exp Med* 2010; 207: 1283-1292.
107. JONGBLOED SL, KASSIANOS AJ, McDONALD KJ, CLARK GJ, JU X, ANGEL CE et al. Human CD141+ (BDCA-3)+ dendritic cells (DCs) represent a unique myeloid DC subset that cross-presents necrotic cell antigens. *J Exp Med* 2010; 207: 1247-1260.

108. CAMINSCHI I, PROIETTO AI, AHMET F, KITSOULIS S, SHIN TEH J, LO JC, et al. The dendritic cell subtype-restricted C-type lectin Clec9A is a target for vaccine enhancement. *Blood* 2008; 112: 3264-3273.
109. DORNER BG, DORNER MB, ZHOU X, OPITZ C, MORA A, GUTTNER S et al. Selective expression of the chemokine receptor XCR1 on cross-presenting dendritic cells determines cooperation with CD8+ T cells. *Immunity* 2009; 31: 823-833.
110. DALOD M. Professional cross-presenting CD8alpha-type CD141(hi) dendritic cells: we have got you in our skin! *Immunity* 2012; 37: 3-5.
111. MITTAG D, PROIETTO AI, LOUDOVARIS T, MANNERING SI, VREMEC D, SHORTMAN K et al. Human dendritic cell subsets from spleen and blood are similar in phenotype and function but modified by donor health status. *J Immunol* 2011; 186: 6207-6217.
112. HANIFFA M, SHIN A, BIGLEY V, MCGOVERN N, TEO P, SEE P et al. Human tissues contain CD141hi cross-presenting dendritic cells with functional homology to mouse CD103+ nonlymphoid dendritic cells. *Immunity* 2012; 37: 60-73.
113. SEGURA E, DURAND M, AMIGORENA S. Similar antigen cross-presentation capacity and phagocytic functions in all freshly isolated human lymphoid organ-resident dendritic cells. *J Exp Med* 2013; 210: 1035-1047.
114. COHN L, CHATTERJEE B, ESSELBORN F, SMED-SØRENSEN A, NAKAMURA N, CHALOUNI C et al. Antigen delivery to early endosomes eliminates the superiority of human blood BDCA3+ dendritic cells at cross presentation. *J Exp Med* 2013; 210: 1049-1063.
115. SANCHO D, JOFFRE OP, KELLER AM, ROGERS NC, MARTINEZ D, HERNANZ-FALCON P et al. Identification of a dendritic cell receptor that couples sensing of necrosis to immunity. *Nature* 2009; 458: 899-903.
116. IBORRA S, IZQUIERDO HM, MARTINEZ-LOPEZ M, BLANCO-MENENDEZ N, REIS E SOUSA C, SANCHO D. The DC receptor DNGR-1 mediates cross-priming of CTLs during vaccinia virus infection in mice. *J Clin Invest* 2012; 122:1628-1643.
117. ZELENAY S, KELLER AM, WHITNEY PG, SCHRAML BU, DEDDOUCHE S, ROGERS NC et al. The dendritic cell receptor DNGR-1 controls endocytic handling of necrotic cell antigens to favor cross-priming of CTLs in virus-infected mice. *J Clin Invest* 2012; 122: 1615-1627.
118. SANCHO D, REIS E SOUSA C. Signaling by myeloid C-type lectin receptors in immunity and homeostasis. *Annu Rev Immunol* 2012; 30: 491-529.
119. JIANG W, SWIGGARD WJ, HEUFLE C, PENG M, MIRZA A, STEINMAN RM et al. The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing. *Nature* 1995; 375: 151-155.
120. HAWIGER D, INABA K, DORSETT Y, GUO M, MAHNKE K, RIVERA M et al. Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. *J Exp Med* 2001; 194: 769-779.
121. GELJTENBEEK TB, TORENSMA R, VAN VLIET SJ, VAN DUJINHOVEN GC, ADEMA GJ, VAN KOYK Y et al. Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell* 2000; 100: 575-585.
122. VAN DEN BERG LM, GRINGHUIS SI, GELJTENBEEK TB. An evolutionary perspective on C-type lectins in infection and immunity. *Ann N Y Acad Sci* 2012; 1253: 149-158.
123. PALUCKA K, BANCHEREAU J, MELLMAN I. Designing vaccines based on biology of human dendritic cell subsets. *Immunity* 2010; 33: 464-478.
124. GALLUZZI L, SENOVILLA L, VACCHELLI E, EGGERMONT A, FRIDMAN WH, GALON J et al. Trial watch: Dendritic cell-based interventions for cancer therapy. *Oncoimmunology* 2012; 1: 1111-1134.
125. FINN OJ. Cancer immunology. *N Engl J Med* 2008; 358: 2704-2715.
126. MELIEF CJ. Cancer immunotherapy by dendritic cells. *Immunity* 2008; 29: 372-383.
127. DELAMARRE L, MELLMAN I. Harnessing dendritic cells for immunotherapy. *Semin Immunol* 2011; 23: 2-11.
128. MELERO I, VILE RG, COLOMBO MP. Feeding dendritic cells with tumor antigens: self-service buffet or a la carte? *Gene Ther* 2000; 7: 1167-1170.
129. LE BON A, ETCHART N, ROSSMANN C, ASHTON M, HOU S, GEWERT D et al. Cross-priming of CD8+ T cells stimulated by virus-induced type I interferon. *Nat Immunol* 2003; 4: 1009-1015.

